

PCT

世界知的所有権機関  
国際事務局  
特許協力条約に基づいて公開された国際出願



(51) 国際特許分類7 A23L 1/28, 1/221, 1/227, 1/231	A1	(11) 国際公開番号  (43) 国際公開日	WO00/30474 2000年6月2日(02.06.00)
(21) 国際出願番号 PCT/JP99/06576		石黒恭佑ISHIGURO, Kyousuke)[JP/JP] 上田要一UEDA, Yoichi)[JP/JP]	
(22) 国際出願日 1999年11月25日(25.11.99)		〒210-8681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社 食品研究所内 Kanagawa, (JP)	
(30) 優先権データ 特願平10/335385 特願平10/335386 特願平11/194172 特願平11/194209	JP JP JP JP	(74) 代理人 霜越正夫, 外(SHIMOKOSHI, Masao et al.) 〒103-0027 東京都中央区日本橋三丁目15-2 高慶ビル9階 Tokyo, (JP)	
(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 味の素株式会社(AJINOMOTO CO., INC.)(JP/JP) 〒104-8315 東京都中央区京橋一丁目15-1 Tokyo, (JP)		(81) 指定国 BR, CN, ID, IN, JP, KR, SG, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)	
(72) 発明者 ; および (75) 発明者／出願人 (米国についてのみ) 香村正徳(KOIMURA, Masanori)(JP/JP) 西村康史(NISHIMURA, Yasushi)(JP/JP) 佐野宏一朗(SANO, Koh-ichiro)(JP/JP) 川口宏和(KAWAGUCHI, Hirokazu)(JP/JP) 日比野悟(HIBINO, Gaku)(JP/JP) 杉本玲子(SUGIMOTO, Reiko)(JP/JP) 西内博章(NISHIUCHI, Hiroaki)(JP/JP) 若林秀彦(WAKABAYASHI, Hidehiko)(JP/JP)		添付公開書類 国際調査報告書	

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING FLAVOR-ENHANCING AGENT FOR FOODS

(54) 発明の名称 食品の風味増強用素材の製造法

## (57) Abstract

A yeast extract containing  $\gamma$ -glutamylcysteine in an amount of 1 % by weight or more based on the solid matters; a process for producing a food material (for example, yeast cells) being rich in cysteine which is characterized by maintaining the food material at 50 to 120 °C in the absence of sugar and in the presence of water at pH 1 to 7, or treating the food material with  $\gamma$ -glutamylpeptide hydrolase at pH 3 to 9 at 15 to 70 °C; and a process for producing a flavor-enhancing agent for foods capable of enhancing the flavor (beef flavor, dried bonito flavor, etc.) of foods or drinks which comprises treating food materials with  $\gamma$ -glutamylpeptide hydrolase and then adding a reducing sugar to thereby solve the problems of, for example, causing a strong scorching taste.

(57)要約

本明細書には、ヨーグルタミルシスティンを固形分に占める割合で1重量%以上含有する酵母エキス、酵母菌体などの食品素材を、糖の非存在下かつ水の存在下、pH 1~7において50~120°Cに保持すること、またはこれにpH 3~9で15~70°Cにおいてヨーグルタミルペプチド加水分解酵素を作用させることを特徴とするシステムを高含有量で含有する食品素材の製造法が開示されている。また、ヨーグルタミルペプチド加水分解酵素を作用させた後に、さらに還元糖を加えることにより、コゲ臭が強いなどの問題点を免れた、飲食品にビーフフレーバーや蟹節フレーバー等の風味を増強する食品の風味増強用素材の製造法が開示されている。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦	DM ドミニカ	KZ カザフスタン	RJ ロシア
AL アルバニア	EE エストニア	LC セントルシア	SD スーダン
AM アルメニア	ES スペイン	LJ リヒテンシュタイン	SE スウェーデン
AT オーストリア	FI フィンランド	LK スリ・ランカ	SG シンガポール
AU オーストラリア	FR フランス	LR リベリア	S1 スロヴェニア
AZ アゼルバイジャン	GA ガボン	LS レソト	SK スロ伐キア
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB 英国	LT リトアニア	SL シエラ・レオネ
BB バルバドス	GD グレナダ	LU ルクセンブルグ	SN セネガル
BE ベルギー	GE グルジア	LV ラトヴィア	SZ スワジ兰ド
BF グルギア・ファン	GH ガーナ	MA モロッコ	TD チャード
BG ブルガリア	GM ガンビア	MC モナコ	TG トゴ
BJ ヘナン	GN ギニア	MD モルドバ	TJ タジキスタン
BR ブラジル	GW ギニア・ビサオ	MG マダガスカル	TZ タンザニア
BY ベラルーシ	GR ギリシャ	MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TM トルクメニスタン
CA カナダ	HR クロアチア	共和国	TR トルコ
CF 中央アフリカ	HU ハンガリー	ML マリ	TT トリニダッド・トバゴ
CG コンゴ	ID インドネシア	MN モンゴル	UA ウクライナ
CH スイス	IE アイルランド	MR モーリタニア	UG ウガンダ
CI コートジボアール	IL イスラエル	MW マラウイ	US 米国
CM カメルーン	IN インド	MX メキシコ	UZ ウズベキスタン
CN 中国	IS イスランド	NE ニジェール	VN ヴィエトナム
CR コスタリカ	IT イタリア	NL オランダ	YU ユーゴスラビア
CL キューバ	JP 日本	NO ノルウェー	ZA 南アフリカ共和国
CY キプロス	KE ケニア	NZ ニュー・ジーランド	ZW ジンバブエ
CZ チェコ	KG キルギスタン	PL ポーランド	
DE ドイツ	KP 北朝鮮	PT ポルトガル	
DK デンマーク	KR 韓国	RO ルーマニア	

## 明細書

## 食品の風味増強用素材の製造法

## (技術分野)

本発明は、 固形分中  $\gamma$ -グルタミルシステイン（本明細書においては、 別異の指示のない時は、  $\gamma$ -グルタミルシステインは、 その酸化型ジスルフィドを含む）を 1 %（重量%）以上の高含有量で含有する酵母エキスおよび酵母菌体などの食品素材を原料として、 これを pH 酸性乃至中性領域で加熱すること、 またはこれに  $\gamma$ -グルタミルペプチド加水分解酵素を作用させることにより、 容易にシステイン（本明細書においては、 別異の指示のない時は、 システインは、 その酸化型ジスルフィドであるシスチンを含む）を高含有量で含む食品素材を得る方法に関する。

本発明は、 また、  $\gamma$ -グルタミルシステイン又は 固形分中  $\gamma$ -グルタミルシステインを 1 %（重量%）以上の高含有量で含有する酵母エキスおよび酵母菌体などの食品素材を原料として、 これを pH 酸性乃至中性領域で加熱し、 またはこれに  $\gamma$ -グルタミルペプチド加水分解酵素を作用させた後に還元糖を加えることにより容易に食品の風味増強用素材を得る方法、 及びこのような方法によって得られた食品の風味増強用素材を加熱することにより容易に食品の風味増強剤を得る方法に関する。

本発明は、 さらにまた、  $\gamma$ -グルタミルシステインを高含有量で含有する食品用途酵母菌体そのもの、 延いては酵母エキスそのもの、 又はこれらを製造する方法に関する。

## (背景技術)

システィンは食品の風味改善などを目的に用いられている。システィンの製法については蛋白分解法や半合成法などが知られているが、現在主に用いられている方法は蛋白分解法と半合成法である。

システィンを上記の目的で用いる場合、これを高含有量で含有する食品素材の強い要望があるが、システィンを高含有量で含有する食品素材は従来ほとんど知られていない。

例えば、 $\alpha$ -グルタミルシステインを酵母菌体内に蓄積させた例として、遺伝子工学的に $\alpha$ -グルタミルシステイン合成酵素を過剰発現させ、菌体乾燥重量当たり最高2%の $\alpha$ -グルタミルシステインを蓄積させた報告がある（大竹ら、バイオサイエンスとインダストリー、50巻、10号、989～994頁、1992年）。しかし、この結果はあくまで遺伝子工学を用いた実験室酵母というモデルを用いて、自然界では通常あり得ない形で作製された $\alpha$ -グルタミルシステインの高蓄積酵母についてのものである。また、この報告においては、この酵母を用いて食品用途の素材とするなどという発想の記載はない。

また、 $\gamma$ -グルタミルシスティンまたは $\gamma$ -グルタミルシスティンを含有する酵母エキスなどを食品に添加するとコク味が増強されることが知られている。また、 $\gamma$ -グルタミルシスティンまたは $\gamma$ -グルタミルシスティンを含有する酵母エキスなどを糖の共存下で加熱して得られる食品素材が食品の風味増強に有効であることは、例えば、特開平4-66069号公報、同4-91762号公報などにより既に知られている。

詳述すると、前者（特開平4-66069号公報）によれば、「より好ましいミートフレーバー調味料を得るべく、銳意研究を重ねた結果、グルタチオン、システイン、またはグルタミルシステインなどの含硫化合物を2～20重量%（固体物濃度）含有する酵母エキスに糖類および必要に応じてアミノ酸類を添加し、脂肪非存在下で加熱することにより、上述の酵母由来の不快臭・不快味がない、

良質で安定性に優れたローストミートフレーバー様調味料が得られるとの知見を得るに至」り（同公報「問題を解決するための手段」冒頭）、このような知見に基づいて「グルタチオン、システイン、またはグルタミルシステインなどの含硫化合物を一定量（エキス当たり2～20重量%）含有する酵母エキスに糖類並びに必要に応じてアミノ酸を添加し、脂肪非存在下で温度70～180°C、10～180分間加熱することを特徴とする調味料の製造法」を完成したという（同公報「特許請求の範囲」）。

また、後者（特開平4-91762号公報）によれば、「既存のミートフレーバーには多種多様のものがあるが、いずれも、天然の肉のロースト香とは異なる質を有するものであり、天然のローストミートフレーバーにより近い質をもった、フレーバー付与剤が望まれていた。」ところ（同公報「発明の解決しようとする問題点」）、「これらの欠点を解決することを目的として、各種アミノ酸と糖類の加熱褐変フレーバーに関する研究を行った結果、 $\gamma$ -グルタミルシステインに糖類を添加した後に水に溶解し、温度70～180°C、10～180分間加熱反応を行うことによって、従来なしえなかった良好なローストミート香を有するフレーバー組成物を製造し得ることを発見し、本発明を完成した。」とし（同公報「問題点を解決するための手段」）、「 $\gamma$ -グルタミルシステインに、糖類を添加して、温度70～180°C、10～180分間加熱することを特徴とするフレーバー組成物の製造法。」を開示する。

しかしながら、これらのフレーバー調味料については、ミートフレーバーが増加するが、これと同時にコゲ臭が強くなるという問題点が指摘される。

#### （発明の開示）

前項記載の従来技術の背景下に、本発明は、システインを高含有量で含有する食品素材を提供することを目的とする。

前項記載の従来技術の背景下に、本発明は、また、コケ臭が強いなどの前記問題点を免れた、飲食品にビーフフレーバーや鰹節フレーバー等の風味を増強する食品の風味増強用素材及び風味増強剤を提供することを目的とする。

前項記載の従来技術の背景下に、本発明は、さらにまた、上記の食品素材、食品の風味増強用素材又は風味増強剤の製造原料として適当な $\gamma$ -グルタミルシステインを高含有量で含有する食品用途酵母菌体、延いては酵母エキスを提供することを目的とする。

本発明者は、前項記載の目的を達成すべく鋭意検討の結果、 $\gamma$ -グルタミルシステインは、これをpH 1～7において50～120℃で加熱すると3～300分でシステインとPCA（ピロリドンカルボン酸）に分解するため、システインが全体として高収率で得られること、また、 $\gamma$ -グルタミルシステインを $\gamma$ -グルタミルペプチド加水分解酵素を用いて加水分解させると $\gamma$ -グルタミルシステインはシステインとグルタミン酸に分解するため、システインが全体として高収率で得られること、さらにまた、 $\gamma$ -グルタミルシステインを1%（重量%）以上含有する酵母菌体または酵母エキスを、糖の非存在下、含水状態で同様に加熱し、またはこれに $\gamma$ -グルタミルペプチド加水分解酵素を作用させるとシステイン高含有酵母エキスが得られることを見出し、このような知見に基づいて本発明の第一（第一の発明）を完成した。

すなわち、本発明は、 $\gamma$ -グルタミルシステインを固形分に占める割合で1重量%以上含有する食品素材を、糖の非存在下かつ水の存在下、pH 1～7において50～120℃に保持する、またはこれにpH 3～9で15～70℃において $\gamma$ -グルタミルペプチド加水分解酵素を作用させることを特徴とするシステイン高含有食品素材の製造法、およびこのような方法であって原料の食品素材が酵母エキスまたは酵母菌体であることを特徴とするものに関する。

本発明者は、前項記載の目的を達成すべく更に鋭意研究の結果、 $\gamma$ -グルタミルシステイン又は $\gamma$ -グルタミルシステインを固形分に占める割合で1%（重量%）以上の高含有量で含有する酵母菌体もしくは酵母エキスを還元糖の非存在下、酸性乃至中性のpH領域において50～120℃で3～300分加熱し、またはpH3～9かつ15～70℃において $\gamma$ -グルタミルペプチド加水分解酵素を作用させた後に、統いて還元糖を加えて得られる素材が食品の風味増強に有効であること、及びこのような素材を加熱すると食品の優れた風味増強剤となり得ることを見出し、このような知見に基づいて本発明の第二（第二の発明）を完成した。

すなわち、本発明は、 $\gamma$ -グルタミルシステイン又は $\gamma$ -グルタミルシステインを固形分に占める割合で1重量%以上含有する食品素材を、還元糖の非存在下かつ水の存在下、pH1～7において50～120℃に3～300分間保持し、またはpH3～9かつ15～70℃において $\gamma$ -グルタミルペプチド加水分解酵素を作用させた後に還元糖を前記 $\gamma$ -グルタミルシステインに対する割合で1～10倍モル加えることを特徴とする食品の風味増強用素材の製造法、およびこのようにして得られた食品の風味増強用素材を50～180℃に10～300分間保持することを特徴とする食品の風味増強剤の製造法に関する。

本発明者は、前項記載の目的を達成すべく更に鋭意研究の結果、食品用途酵母として代表的な *Saccharomyces cerevisiae* において、1%を超える乾燥菌体あたりの重量をもつ $\gamma$ -グルタミルシステインを高含有する酵母を作出し、その酵母菌体から酵母エキスを調製する方法（このエキス中には $\gamma$ -グルタミルシステインが高濃度で含有されている）、さらにその酵母エキスを加熱処理することにより、加熱前よりもシステインの含有量が上昇した酵母エキスを得ることに成功し、これに基づいて本発明の第三（第三の発明）を完成した。すなわち、本発明は、 $\gamma$ -グルタミルシステインを固形分に占める割合で1重量%以上の高含有量で含有することを特徴とする食品用途酵母菌体又は酵母エキスに関する。

因みに、上記本発明の第一、本発明の第二および本発明の第三は、これまでの説明からおよびこれから説明から理解できるように、单一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明を構成している。

以下、本発明を詳細に説明する。

先ず、上記第一の発明について説明する。

本発明の製造法における原料である食品素材は、 $\gamma$ -グルタミルシステインを固形分に占める割合で1重量%以上の高含有量で含有する食品素材である。 $\gamma$ -グルタミルシステインの含有量が1%以下のものは、得られる風味力価が弱く工業的には実用的でないので好ましくない。

そのような食品素材としては、例えば、 $\gamma$ -グルタミルシステインの固形分に占める割合が1重量%以上の酵母菌体や酵母エキスを挙げることができる。因みに、このような $\gamma$ -グルタミルシステインを高含有量で含有する酵母菌体は、例えば、後掲実施例7に記載の方法または突然変異で $\gamma$ -グルタミルシステインを高含有するようになった酵母を自然界より分離もしくは変異処理することによって得ることができる。また、酵母エキスは、このような酵母菌体から抽出もしくは自己消化することにより又は $\gamma$ -グルタミルシステインの含有量が前記所定量に達していない酵母エキスに $\gamma$ -グルタミルシステインを補添することにより調製することができる。

本発明によれば、このような食品素材を水の存在下、酸性乃至中性のpH領域、すなわち、pH 1~7において50~120°Cに保持して加熱をする。水の存在量は、操作性の見地から定められ、例えば、食品素材に対し、その1重量部(乾物換算)当たり1~100重量部とすることができます。pHは前記の範囲外では、システインの生成量が少なくなり好ましくない。なお、pHの調整は、食品とし

て許容される塩酸などの酸や水酸化ナトリウムなどの塩基によって行うことができるることは言うまでもない。加熱温度は、これが低温に過ぎると $\gamma$ -グルタミルシステインの分解反応の進行が遅く、逆に、高温に過ぎると一旦生成したシステインが副反応によって減少してしまい好ましくない。上記の加熱条件で食品素材を加熱処理すると、3～300分間でシステインが多量に生成蓄積したシステイン高含有食品素材が得られる。加熱時間は、これが短かすぎると反応が完了せず、逆に長すぎるとやはり一旦生成したシステインが副反応により減少してしまい好ましくない。

$\gamma$ -グルタミルシステイン分解反応は、糖、特にグルコース、フラクトース、キシロース、マルトースなどの還元糖を添加せず、それらの非存在下で行なうことが肝要である。これは生成したシステインが糖、特にこれらの還元糖と反応して焦げ臭を発するのや褐変反応を防ぐためである。

また、 $\gamma$ -グルタミルシステインは、これからシステインを生成させるには酵素を作用させる方法も挙げられる。すなわち、 $\gamma$ -グルタミルシステインのペプチド結合を加水分解する酵素（ $\gamma$ -グルタミルペプチド加水分解酵素）を前記の食品素材にpH3～9かつ15～70℃において作用させる。水の存在量は、操作性の見地から定められ、例えば、食品素材に対し、その1重量部（乾物換算）当たり1～100重量部とすることができる。pHおよび温度は前記の範囲外では $\gamma$ -グルタミルペプチド加水分解酵素の活性が弱まり、好ましくない。上記の条件で食品素材を酵素処理すると、1～300分間でシステインが多量に生成蓄積したシステイン高含有食品素材が得られる。

$\gamma$ -グルタミルペプチド加水分解酵素には数多くの種類が存在するが、特に本発明の実施上有用なものとしては $\gamma$ -グルタミルトランスフェラーゼ、 $\gamma$ -グルタミルシクロトランスフェラーゼ、グルタミナーゼなどを挙げることができる。

このように作成したシステイン高含有食品素材は、そのまま液体の状態で、濃

縮してペーストの状態で、または乾燥して粉末の状態で、その他顆粒の状態など、適宜の形態で流通におくことができる。

次に、前記第二の発明について説明する。

まず第一に、本発明の食品の風味増強用素材の製造方法について説明する。これは、例えば、先に述べたように、pH酸性乃至中性領域において $\alpha$ -グルタミルシステイン又は $\alpha$ -グルタミルシステインを1%（重量%）以上含有する酵母菌体または酵母エキスを還元糖の非存在下で加熱し、または $\alpha$ -グルタミルペプチド加水分解酵素を作用させ、続いて糖を加えることにより製造することができる。

このような製造法における原料である食品素材は、本発明の第一に関して先に説明したところと同様に、 $\alpha$ -グルタミルシステインを固形分に占める割合で1重量%以上の高含有量で含有する食品素材である。 $\alpha$ -グルタミルシステインの含有量が1%以下のものは、得られる風味力価が弱く工業的には実用的でないで好ましくない。

そのような素材としては、例えば、 $\alpha$ -グルタミルシステインの固形分に占める割合が1重量%以上の酵母菌体や酵母エキスを挙げることができる。因みに、このような $\alpha$ -グルタミルシステインを高含有量で含有する酵母菌体は、例えば、後掲実施例7に記載の遺伝子工学的方法によって得ることができる。また、酵母エキスは、このような酵母菌体から抽出もしくは自己消化することによりまたは $\alpha$ -グルタミルシステインを補添することにより調製することができる。これは、本発明の第一に関して先に説明したところと同様である。

本発明によれば、先ず、 $\alpha$ -グルタミルシステイン又は $\alpha$ -グルタミルシステインを高含有量で含有する前記のような食品素材を還元糖の非存在下かつ水の存在下、酸性乃至中性のpH領域、すなわち、pH1～7において50～120°C

に3～300分間保持して加熱をする。このようなpH、温度および時間の条件それ自体は、本発明の第一に関して先に説明したところと同様である。

水の存在量は、操作性の見地から定められ、例えば、 $\gamma$ -グルタミルシステイン又はこれを高含有量で含有する食品素材に対し、その1重量部（乾物換算）当たり1～100重量部とすることができます。

因みに、本発明者は、別途、 $\gamma$ -グルタミルシステインをpH1～7において50～120°Cで、例えば3～300分加熱すると、 $\gamma$ -グルタミルシステインはシステインとPCA（ピロリドンカルボン酸）に分解するため、システインが全体として高収率で得られること、さらに又、 $\gamma$ -グルタミルシステインを1%（重量%）以上含有する酵母菌体または酵母エキスを、還元糖の非存在下、含水状態で同様に加熱するとシステイン高含有酵母エキスが得られることを見出しているが、本発明に係わる食品用組成物の風味増強作用は、 $\gamma$ -グルタミルシステインからこのようにして生成するシステインによるものである。

そして、pHは前記の範囲外では、システインの生成量が少なくなり好ましくない。なお、pHの調整は、食品として許容される塩酸などの酸や水酸化ナトリウムなどの塩基によって行うことができることはいうまでもない。これは、本発明の第一に関して上に説明したところと同じである。

加熱温度は、これが低温に過ぎると $\gamma$ -グルタミルシステインの分解反応の進行が遅く、逆に、高温に過ぎると一旦生成したシステインが副反応により減少してしまい好ましくない。加熱時間は、これが短すぎると反応が完了せず、逆に長すぎるとやはり一旦生成したシステインが副反応により減少してしまい好ましくない。これも、また、本発明の第一に関して上に説明したところと同じである。

本発明者の知見によれば、先に説明したように、 $\gamma$ -グルタミルシステインをpH1～7の酸性乃至中性領域において特定の温度で特定時間加熱すると、 $\gamma$ -グルタミルシステインはシステインとPCA（ピロリドンカルボン酸）に分解し

て最終的にシステインが高収率で得られ、また、 $\gamma$ -グルタミルシステインを1%（重量%）以上含有する酵母菌体または酵母エキスを、還元糖の非存在下、含水状態で同様に加熱するとシステイン高含有酵母エキスが得られるのである。

$\gamma$ -グルタミルシステインのこのような分解反応は、例えば、グルコース、フラクトース、キシロース、マルトースなどの還元糖を添加せず、これの非存在下で行うことが肝要である。これは、生成したシステインがこれらの還元糖と反応して焦げ臭を発するのや褐変反応を防ぐためである。これは、本発明の第一に関して上に説明したところと同じである。

また、 $\gamma$ -グルタミルシステインは、これからシステインを生成させるには酵素を利用する方法も挙げられる。すなわち、 $\gamma$ -グルタミルシステインのペプチド結合を加水分解する酵素（ $\gamma$ -グルタミルペプチド加水分解酵素）を $\gamma$ -グルタミルシステイン又は前記の食品素材にpH3～9かつ15～70°Cにおいて1～300分間作用させる。水の存在量は、操作性の見地から定められ、例えば、食品素材に対し、その1重量部（乾物換算）当たり1～100重量部とすることができる。pHおよび温度は前記の範囲外では $\gamma$ -グルタミルペプチド加水分解酵素の活性が弱まり、好ましくない。これは、本発明の第一に関して上に説明したところと同じである。

$\gamma$ -グルタミルペプチド加水分解酵素には数多くの種類が存在するが、特に本発明の実施上有用なものとしては $\gamma$ -グルタミルトランスフェラーゼ、 $\gamma$ -グルタミルシクロトランスフェラーゼ、グルタミナーゼなどを挙げることができる。これも、本発明の第一に関して上に説明したところと同じである。

このように作成したシステイン高含有の加熱処理生成物は、これに前記のような還元糖を前記 $\gamma$ -グルタミルシステインに対する割合で1～10倍モル加えることにより本発明の食品の風味増強用素材とすることができます。

還元糖としては、グルコース、フラクトース、キシロース、マルトースなどを

挙げることができ、これらの還元糖は、安価で入手容易であり、また食品としての利用可能の理由から好ましい。

還元糖の添加量（使用量）は、上記のように、原料のアーグルタミルシステイン又はこれを含有する酵母菌体若しくは酵母エキスなどの天然食品素材に含まれるアーグルタミルシステインに対する割合でこれの1モル当たり1～10モルである。添加量がこの範囲より少ないと効果が弱く、一方、多いと甘味が強くなつて共に好ましくない。

このようにして製造することのできる風味増強用素材は、これをそのまま液体の状態で、濃縮してペーストの状態で、または乾燥して粉末の状態で、その他顆粒の状態など、適宜の形態で流通に置くことができる。本発明の風味増強用素材は、後に食品加工に使用された場合に加工処理における加熱工程において、それに含まれるシステインと還元糖が反応して風味増強効果を奏するのである。

次に、本発明の食品の風味増強剤の製造法について説明する。これは、例えば、上に説明した本発明の風味増強用素材を適当な条件で加熱処理することによって得ることができる。

加熱処理に際して、風味増強効果を得る目的で、システイン濃度が0.1重量%以上、好ましくは0.6重量%以上になるように必要に応じて濃縮してから加熱する。加熱条件は、50～180°Cで10～300分の範囲で焦げ臭や褐変反応の起こらない範囲とする。このような加熱条件には、例えば、50～60°Cで180～300分というような低温で長時間および90～100°C（沸点前後）で30～120分というような高温で短時間加熱する条件が含まれる。

例えば、このように作成することのできる本発明の食品の風味増強剤は、先の風味増強用素材と同様に、そのまま液体の状態で、濃縮してペーストの状態で、または乾燥して粉末の状態で、その他顆粒の状態など、適宜の形態で流通に置くことができる。

最後に、前記第三の発明について説明する。

γ-アーグルタミルシステインを高含有量で含有する、本発明の食品用途酵母（菌体）は、次のようにして作成する。すなわち、先ず、グルタチオン合成酵素の遺伝子であるGSH2を破壊することによってグルタチオン合成酵素が機能しなくなった酵母を作成し、次に、これを常法により培養するのである。

因みに、GSH2遺伝子が生育に必須な遺伝子でないことは既に報告されている（Chris M. Grantら、Molecular Biology of the Cell、8巻、1699頁から1707頁、9月、1997年）。生育に必須でない遺伝子の破壊は、公知のことく1遺伝子の自然突然変異でも容易に生起する現象であることから、本発明の後掲実施例7は、自然な状況下で起こりうる結果の一例であるといえる。

また、本発明においては、作製した酵母から実際に酵母エキスを作製し、それがγ-アーグルタミルシステイン、延いてはシステインを高含有する食品素材であることを明らかに示した。

#### （図面の簡単な説明）

図1は、pH3における還元型γ-アーグルタミルシステインの分解による生成システイン量の時間的消長を示す（検査例1）。

図2は、pH5における還元型γ-アーグルタミルシステインの分解による生成システイン量の時間的消長を示す（検査例1）。

図3は、pH7における還元型γ-アーグルタミルシステインの分解による生成システイン量の時間的消長を示す（検査例1）。

図4は、グルタミナーゼによる還元型γ-アーグルタミルシステインの分解にともなう生成システイン量のpH5におけるグルタミナーゼ量に対する依存性を示す（検査例2）。

図5は、グルタミナーゼによる還元型 $\gamma$ -グルタミルシステインの分解にともなう生成システイン量のpH7におけるグルタミナーゼ量に対する依存性を示す（検査例2）。

図6は、グルタミナーゼによる還元型 $\gamma$ -グルタミルシステインの分解にともなう生成システイン量のpH9におけるグルタミナーゼ量に対する依存性を示す（検査例2）。

図7は、H4△GSH2株菌体中の含硫化合物量を示す（実施例7）。

図8は、H4△GSH2酵母エキス中の含硫化合物量の変化を示す（実施例7）。

(発明を実施するための最良の形態)

以下、検査例および実施例により本発明を更に詳しく説明する。

先ず、本発明の第一の検査例および実施例を掲げる。

### 検査例 1 (加熱によるアーグルタミルシステインからのシスティンの生成)

pHの異なる（すなわち、pH3、5および7の）還元型 $\gamma$ -グルタミルシステインの1mmol濃度の水溶液を98°Cで加熱した際の生成システイン量の経時的消長を調べた。結果を後掲図1～3に示す。図中、PCAはピロリドンカルボン酸を、 $\gamma$ -Glu-Cysは還元型 $\gamma$ -グルタミルシステインを、そしてTotal Cysteineはシステインを表す。

図1～3より理解されるように、加熱によりアーグルタミルシスティンからシスティンが高収率で得られる。

## 検査例2 (酵素によるアーケルタミルシステインからのシステインの生成)

pHの異なる（すなわち、pH 5、7および9の）還元型γ-グルタミルシスティンの1mmol/l濃度の水溶液に「グルタミナーゼ ダイワ」（大和化成社製

グルタミナーゼ、比活性3.0 mM/min/mg)を種々の濃度で加え、37°Cで10分間作用させたときの生成システィンの量を調べた(γ-グルタミルシスティンの加水分解の酵素量依存性)。結果を後掲図4~6に示す。図中、γ-Glu-Cysは還元型γ-グルタミルシスティンを、そしてTotal Cysteineはシスティンを表す。

図4~6より理解されるように、グルタミナーゼによりγ-グルタミルシスティンの加水分解にともなってこれから等モルのシスティンが得られる(高収率)。

#### 実施例1

γ-グルタミルシスティンを4.5%含有する酵母エキス粉末に水を加え、塩酸でpHを5に調整し、濃度2%の水溶液を作成し、これを98°Cで180分間加熱した後凍結乾燥したところ、2.0%のシスティン含有量を有する酵母エキス粉末が得られた。

因みに、この酵母エキス粉末を調味料の製造に用いたところ、良好なローストミートフレーバを有する調味料が得られた。

#### 実施例2

γ-グルタミルシスティンを4.5%含有する酵母エキス粉末に水を加え、1N NaOHを用いてpHを7に調整し、濃度2%の水溶液を作成した。この溶液にグルタミナーゼ(検査例2で使用のものと同じ)を1mg/mlの濃度になるように加え、37°Cで10分間インキュベートした後凍結乾燥したところ、2.5%のシスティン含有量を有する酵母エキス粉末が得られた。

因みに、この酵母エキス粉末を調味料の製造に用いたところ、実施例1と同様に良好なローストミートフレーバを有する調味料が得られた。

次に、本発明の第二の実施例および検査例を掲げる。

#### 実施例3(γ-グルタミルシスティン)

1 N NaOHを用いてpHを5に調整した $\gamma$ -グルタミルシスティンの4%水溶液を98°Cで3時間加熱した。加熱後グルコースを溶液に対して4% ( $\gamma$ -グルタミルシスティン1モル当たり1.4モルに相当する) 加えた(風味増強用素材)。これを60°Cで180分間加熱した後凍結乾燥した(風味増強剤)。

このようにして得られた凍結乾燥物(本発明の食品の風味増強剤)を用いて市販ビーフコンソメスープの系における官能評価を実施した。本凍結乾燥物は、市販ビーフコンソメスープの固体分に対して0.05%になるように添加し、無添加のものを対照として15名のパネルにより、各評価項目について、より好ましい方またはより強い方を選択させる方法で評価を行った。

結果を下記第1表に示す。表中的人数は、より好ましいまたはより強いとして選択したパネル員の人数である。

第1表：評価結果

0.05%添加	本発明	対照
肉風味の強さ	15人	0人
肉風味の好ましさ	14人	1人
風味全体の強さ	13人	2人
風味全体の好ましさ	12人	3人
総合評価	13人	2人

#### 実施例4 ( $\gamma$ -グルタミルシスティン)

1 N NaOHを用いてpHを7に調整した $\gamma$ -グルタミルシスティンの4%水溶液に1mg/mlとなるようにグルタミナーゼを加え、37°Cで2時間インキュベートした。反応後グルコースを溶液に対して4% ( $\gamma$ -グルタミルシスティン1モル当たり1.4モルに相当する) 加えた(風味増強用素材)。これを60°Cで180分間加熱した後凍結乾燥した(風味増強剤)。

このようにして得られた凍結乾燥物(本発明の食品の風味増強剤)を用いて市

販ビーフコンソメスープの系における官能評価を実施した。本凍結乾燥物は、市販ビーフコンソメスープの固形分に対して 0.05% になるように添加し、無添加のものを対照して 15 名のパネルにより、各評価項目について、より好ましい方またはより強い方を選択させる方法で評価を行った。

結果を下記第 2 表に示す。表中の人数は、より好ましいまたはより強いとして選択したパネル員の人数である。

第 2 表

0.05% 添加	本発明	対照
肉風味の強さ	15 人	0 人
肉風味的好ましさ	15 人	0 人
風味全体の強さ	12 人	3 人
風味全体的好ましさ	14 人	1 人
総合評価	13 人	2 人

#### 実施例 5 (酵母エキス)

アーグルタミルシスティンを 4.5% 含有する酵母エキスの、1 N NaOH を用いて pH を 5 に調整した 20% 水溶液（この水溶液におけるアーグルタミルシスティンの濃度は、0.9%）を 98°C で 3 時間加熱した。加熱後グルコースを溶液に対して 1.8%（対アーグルタミルシスティン 1 モル当たり 2.8 モルに相当する）加えた（風味増強用素材）。これを実施例 3 におけると同じように加熱した後濃縮してからスプレードライした（風味増強剤）。

本乾燥物（本発明の食品の風味増強剤）を用いて（a）市販ビーフコンソメスープ、（b）カレーおよび（c）すまし汁の各系における官能評価を実施した。結果を下記第 3 表に示す。なお、本乾燥物は、固形分に対して表に示す量添加し、無添加のものを対照として、15 名のパネルにより実施例 3 におけると同様にして評価を行ったものである。

第3表：評価結果

## (a) ビーフコンソメスープ

0.05%添加	本発明	対照
肉風味の強さ	14人	1人
肉風味の好ましさ	13人	2人
風味全体の強さ	12人	3人
風味全体の好ましさ	13人	2人
総合評価	13人	2人

## (b) カレー

0.1%添加	本発明	対照
肉風味の強さ	13人	2人
肉風味の好ましさ	12人	3人
風味全体の強さ	13人	2人
風味全体の好ましさ	12人	3人
総合評価	13人	2人

## (c) すまし汁

0.1%添加	本発明	対照
だし風味の強さ	15人	0人
だし風味の好ましさ	14人	1人
風味全体の強さ	14人	1人
風味全体の好ましさ	13人	2人
総合評価	14人	1人

## 実施例6（酵母エキス）

γ-グルタミルシステインを4.5%含有する酵母エキスの、1N NaOHを用いてpHを7に調整した20%水溶液（この水溶液におけるγ-グルタミルシステインの濃度は、0.9%）にグルタミナーゼを1mg/mlとなるように加え、37°Cで2時間インキュベートした。反応後グルコースを溶液に対して1.8%（対γ-グルタミルシステイン1モル当たり2.8モルに相当する）加えた

(風味増強用素材)。これを実施例3におけると同じように加熱した後濃縮してからスプレードライした(風味増強剤)。

本乾燥物(本発明の食品の風味増強剤)を用いて(a)市販ビーフコンソメスープ、(b)カレーおよび(c)すまし汁の各系における官能評価を実施した。結果を下記第4表に示す。なお、本乾燥物は、固形分に対して表に示す量添加し、無添加のものを対照として、15名のパネルにより実施例3におけると同様にして評価を行ったものである。

第4表: 評価結果

## (a) ビーフコンソメスープ

0.05%添加	本発明	対照
肉風味の強さ	12人	3人
肉風味の好ましさ	14人	1人
風味全体の強さ	12人	3人
風味全体の好ましさ	14人	1人
総合評価	14人	1人

## (b) カレー

0.1%添加	本発明	対照
肉風味の強さ	12人	3人
肉風味の好ましさ	13人	2人
風味全体の強さ	12人	3人
風味全体の好ましさ	12人	3人
総合評価	13人	2人

## (c) すまし汁

0.1%添加	本発明	対照
だし風味の強さ	15人	0人
だし風味の好ましさ	15人	0人
風味全体の強さ	14人	1人
風味全体の好ましさ	15人	0人
総合評価	15人	0人

### 検査例 3

$\gamma$ -グルタミルシステインの4%溶液にグルコースを4%加え、pH 5に調整してから98°Cで3時間加熱した後直ちに凍結乾燥した。

このようにして得られた凍結乾燥物の試料（比較試料）および上掲実施例3で調製した本発明の風味増強剤（凍結乾燥物＝本発明試料）を用い、市販ビーフコンソメスープの系に添加し官能評価を実施した。これら2種類の凍結乾燥物の試料は、市販ビーフコンソメスープの固形分に対して0.05%になるように添加し、15名のパネルによる比較評価を行った。すなわち、上記2種類の試料について下記第5表の欄外に示す評価基準により各評価員に採点させ、その平均点を取った。

第5表：評価結果

0.05%添加	比較試料	本発明試料
コゲ臭の強さ	4.6	4.2
肉風味の強さ	4.3	4.6
風味全体の強さ	4.4	4.8
風味全体の好ましさ	4.2	4.6

### ＜評価基準＞

評点 5 : 非常に強い、または好ましい  
4 : 強い、または好ましい  
3 : やや強い、またはやや好ましい  
2 : やや弱い、またはやや好ましくない  
1 : 弱い、または好ましくない

最後に、本発明の第三の実施例を掲げる。

実施例 7

(a)  $\gamma$ -グルタミルシスティンを乾燥菌体重量あたり1%以上含有する食品用

途酵母の育種について以下に説明する。

アーグルタミルシステインは、酵母の細胞内代謝においてはグルタチオン（GSH）生成の1歩手前の中間代謝産物として存在する。アーグルタミルシステインをグルタチオンに変換する酵素はグルタチオンシンターゼである。そこで、グルタチオンシンターゼの遺伝子（以下、GSH2）の機能を失わしめることにより、アーグルタミルシステインを食品用途酵母細胞内に蓄積させることを試みた。

(1) GSH2遺伝子の機能を失わしめる方法として、一段遺伝子破壊法(on e-step-gene-disruption法)を行った。まず、このために必要なGSH2遺伝子破壊カセットの調製を行った。

詳述すると、市販食品用途酵母（パン酵母）*Saccharomyces cerevisiae* に常法により胞子を形成させ、得られた胞子を発芽させて得た株の1株（これをH4株と称する）のGSH2遺伝子の上流領域からGSH2遺伝子末端までの領域をPCR法により増幅した。条件は下記第6表に示す通り。

第6表

酵母染色体遺伝子	1μl
10X PCR buffer	10μl
10mM dNTPs	10μl
10pmol/μl GAL11F (フライマ-)	1μl
配列：5'-TATGAAGACTGTACAGTCTCC-3' (後掲配列番号1の配列)	
10pmol/μl GSH2R3 (フライマ-)	1μl
配列：5'-CCGGGGAGCTCAGCTAAATG GTGTACTTCGCTAC-3' (後掲配列番号2の配列)	
miliQ水	76μl
Taq polymerase	1μl
合計	100μl

備考： 94°C、1 min - 94°C、30 sec - 60°C、40 sec -  
74°C、1 min 30 secを30サイクル繰り返す。

このようにして増幅した遺伝子断片 (G S H 2)を、常法によりプラスミドpGE M-T Easy (Promega社)に連結させてクローン化した（以下、G S H 2 / p G E M）。

同様にしてone-step-gene-disruption法に用いる選択遺伝子マークーとして、URA3遺伝子もPCR法によって増幅した。条件は下記第7表に示す通り。

第7表

10ng/ $\mu$ l pYES2(Invitrogen社)	1 $\mu$ l
10X PCR buffer	10 $\mu$ l
10mM dNTPs	10 $\mu$ l
10pmol/ $\mu$ l URA3F2 (フライマー)	1 $\mu$ l
配列：5' -ATTAACCCGGGTTGATT CGGTAAATCTCCG-3' (後掲配列番号3の配列)	
10pmol/ $\mu$ l URA3R2 (フライマー)	1 $\mu$ l
配列：5' -ATTAACCCGGGTTTTAGTTTGCTGGC-3' (後掲配列番号4の配列)	
miliQ水	76 $\mu$ l
Taq polymerase	1 $\mu$ l
合計	100 $\mu$ l

備考：94°C、1 min-94°C、30 sec-52°C、30 sec-  
74°C、40 secを30サイクル繰り返す。

続いて、G S H 2 / p G E Mを制限酵素M u n Iで切断し、常法により遺伝子末端を平滑化した。その切断末端に、制限酵素S m a Iで遺伝子末端を平滑化したURA3遺伝子を常法によりライゲーションを行い導入した（以下、URA3-G S H 2 / p G E M）。

URA3-G S H 2 / p G E Mを鋳型として、G S H 2 の両端をコードする遺伝子プライマー（上述G A L 1 1 F、G S H 2 R）を用いてPCRを行い、G S H 2 遺伝子破壊カセットを調製した。PCRの条件を下記第8表に示す。

第8表

10ng/ $\mu$ l GSH2/pGEM	1 $\mu$ l
10X PCR buffer	10 $\mu$ l
10mM dNTPs	10 $\mu$ l
10pmol/ $\mu$ l GAL11F (フライマー)	1 $\mu$ l
配列：前に記載(後掲配列番号1の配列)	
10pmol/ $\mu$ l GSH2R (フライマー)	1 $\mu$ l
配列：5'-AGCTAAATGGTGTACTTCGCTAC-3' (後掲配列番号5の配列)	
miliQ水	76 $\mu$ l
Taq polymerase	1 $\mu$ l
合計	100 $\mu$ l

備考：94°C、1 min - 94°C、30 sec - 56°C、30 sec -  
74°C、1 minを30サイクル繰り返す。

(2) 以上 の方法で調製したGSH2遺伝子破壊カセット（以下、URA3-GSH2）を用いて、食品用途酵母H4株のGSH2遺伝子破壊を行った。

まず、H4株を3mlのYPD培地で24時間、30°Cで振とう培養して前培養を行った。その培養菌体液1mlを50mlのYPD培地中に移し、対数増殖期まで培養した後、1Mソルビトールに懸濁した状態にURA3-GSH2を混和して常法によりエレクトロポレーションを行って、GSH2遺伝子が破壊カセットに入れ替わったH4株（以下、H4△GSH2）を取得した。

(b) ヨーグルタミルシステインを乾燥菌体重量あたり1%以上含有する食品用途酵母の培養は、以下のようにして行った。

H4△GSH2株を、グルタチオンを1mM含む3mlの合成最少培地で24時間、30°Cで振とう培養して前培養を行った。その培養菌体液1mlを5mMのシステインを含む50mlの合成最少培地中に移し、48時間の培養を行うことにより菌体を取得した。この菌体を蒸留水で3回洗浄した後、これを70°Cで1分間の抽出処理に付して細胞内容物を抽出した。

これを遠心処理し、得られた上清（酵母エキス抽出液）中の $\gamma$ -グルタミルシステイン含量を測定した。その結果得られた酵母乾燥菌体あたりの $\gamma$ -グルタミルシステイン含量を図7に示す。なお、乾燥菌体重量は、一定培地中に含まれる酵母菌体を濾紙上に取り、105°Cで4時間加熱後に残った菌体重量をもって測定した。

さらに、上記酵母エキス抽出液を常法により凍結乾燥して粉末にした後、その粉末20.2mgを1mlの水に溶かし、溶液のpHを5に合わせた。その一部を98°Cで3時間加熱し、加熱前および加熱後の酵母抽出物（酵母エキス）中の $\gamma$ -グルタミルシステインおよびシステインの含量を測定した。結果を図8に示す。

上記図7および図8において、Total Cysteineはシステインを、 $\gamma$ -Glu-Cysは還元型 $\gamma$ -グルタミルシステインを、そしてGSHはグルタチオンを表す。

なお、本発明の製造法によって得られる $\gamma$ -グルタミルシステインを高含有量で含有する酵母菌体や酵母エキスは、本発明に係わる食品素材、食品の風味増強用素材または食品の風味増強剤の製造原料として使用することができるばかりでなく、その他の用途における $\gamma$ -グルタミルシステインまたはシステインの優れたソースとなり得ることはいうまでもない。

#### （産業上の利用可能性）

本発明によれば、食品の風味改善などに有用なシステイン高含有酵母エキスなどのシステイン高含有天然食品素材を容易に得ることができる。

本発明によれば、また、焦げ臭が強いなどの問題点を免れた、飲食品にビーフフレーバーや鰹節フレーバー等の風味を増強する食品の風味増強用素材や風味増強剤を容易に得ることができる。

本発明に係わる方法によれば、さらにまた、 $\gamma$ -グルタミルシステインを高含有量で含有する酵母菌体を容易に得ることができる。

## 特許請求の範囲

1. ジーグルタミルシステインを固形分に占める割合で1重量%以上含有する食品素材を、糖の非存在下かつ水の存在下、pH 1～7において50～120°Cに保持することを特徴とするシステイン高含有食品素材の製造法。

2. ジーグルタミルシステインを固形分に占める割合で1重量%以上含有する食品素材に、ジーグルタミルペプチド加水分解酵素を水の存在下、pH 3～9かつ15～70°Cにおいて作用させることを特徴とするシステイン高含有食品素材の製造法。

3. ジーグルタミルペプチド加水分解酵素がジーグルタミルトランスフェラーゼ、ジーグルタミルシクロトランスフェラーゼまたはグルタミナーゼであることを特徴とする請求項2記載のシステイン高含有食品素材の製造法。

4. 原料の食品素材が酵母エキスまたは酵母菌体であることを特徴とする請求項1～3のいずれかに記載のシステイン高含有食品素材の製造法。

5. ジーグルタミルシステイン又はジーグルタミルシステインを固形分に占める割合で1重量%以上含有する食品素材を、還元糖の非存在下かつ水の存在下、pH 1～7において50～120°Cに3～300分間保持した後に還元糖を前記ジーグルタミルシステインに対する割合で1～10倍モル加えることを特徴とする食品の風味増強用素材の製造法。

6. ジーグルタミルシステイン又はジーグルタミルシステインを固形分に占める割合で1重量%以上含有する食品素材に、ジーグルタミルペプチド加水分解酵素を水の存在下、pH 3～9かつ15～70°Cにおいて1～300分間作用させた後に還元糖を前記ジーグルタミルシステインに対する割合で1～10倍モル加えることを特徴とする食品の風味増強用素材の製造法。

7. ジーグルタミルペプチド加水分解酵素がジーグルタミルトランスフェラーゼ

ーゼ、 $\gamma$ -グルタミルシクロトランスフェラーゼまたはグルタミナーゼであることを特徴とする請求項 6 記載の食品の風味増強用素材の製造法。

8. 請求項 5 ~ 7 のいずれかに記載の食品の風味増強用素材を 50 ~ 180 °C に 10 ~ 300 分間保持することを特徴とする食品の風味増強剤の製造法。

9.  $\gamma$ -グルタミルシステインを固形分に占める割合で 1 重量 % 以上の高含有量で含有することを特徴とする食品用途酵母菌体又は酵母エキス。

図 1

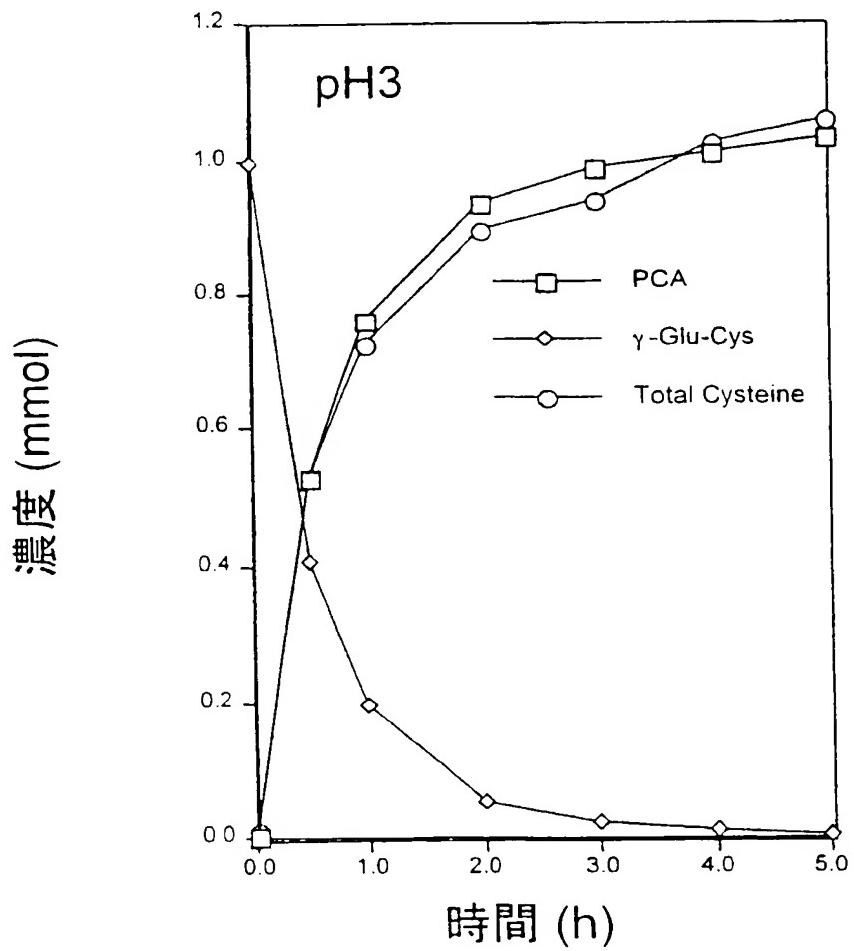


図 2

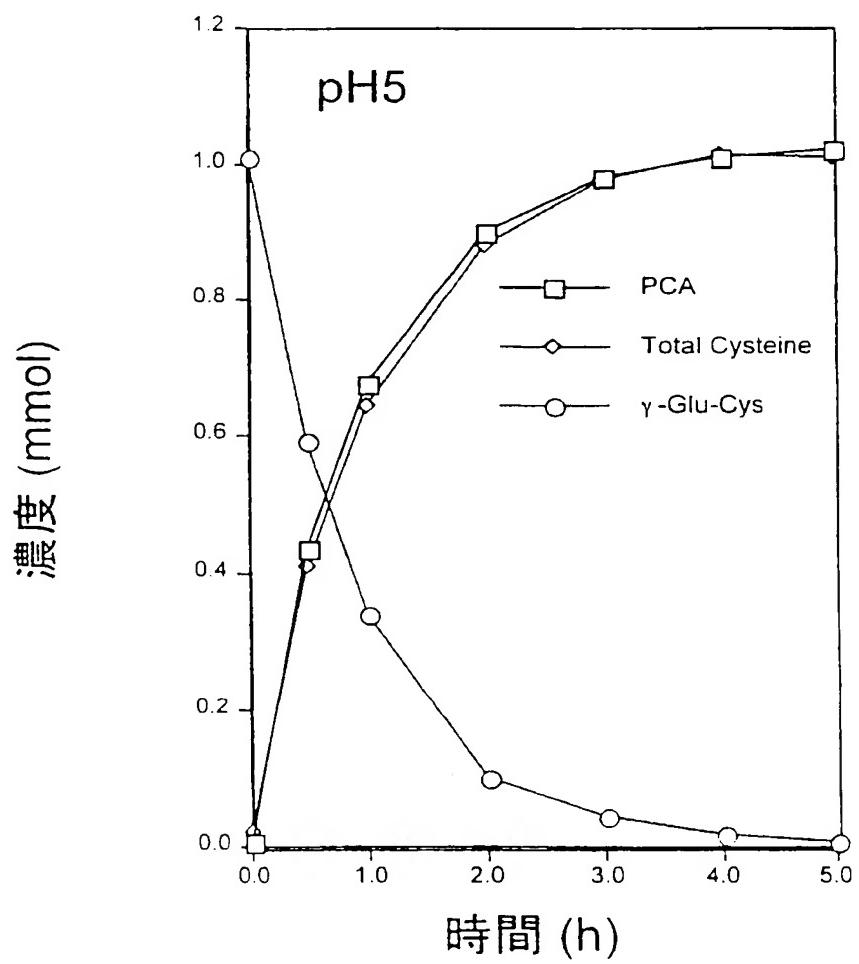


図 3

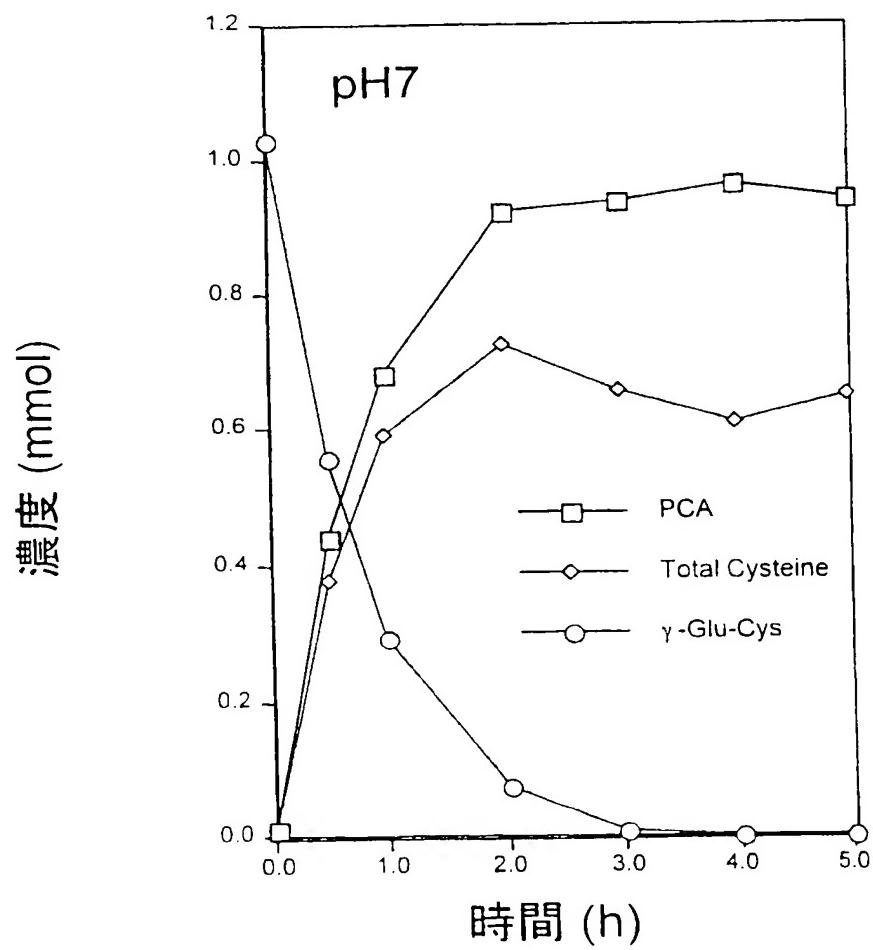


図 4

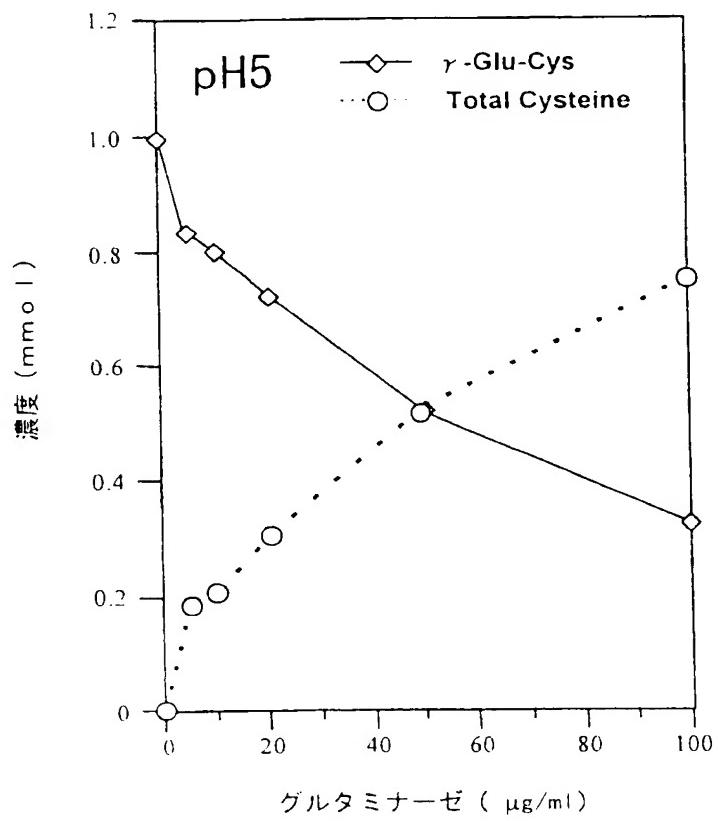


図 5

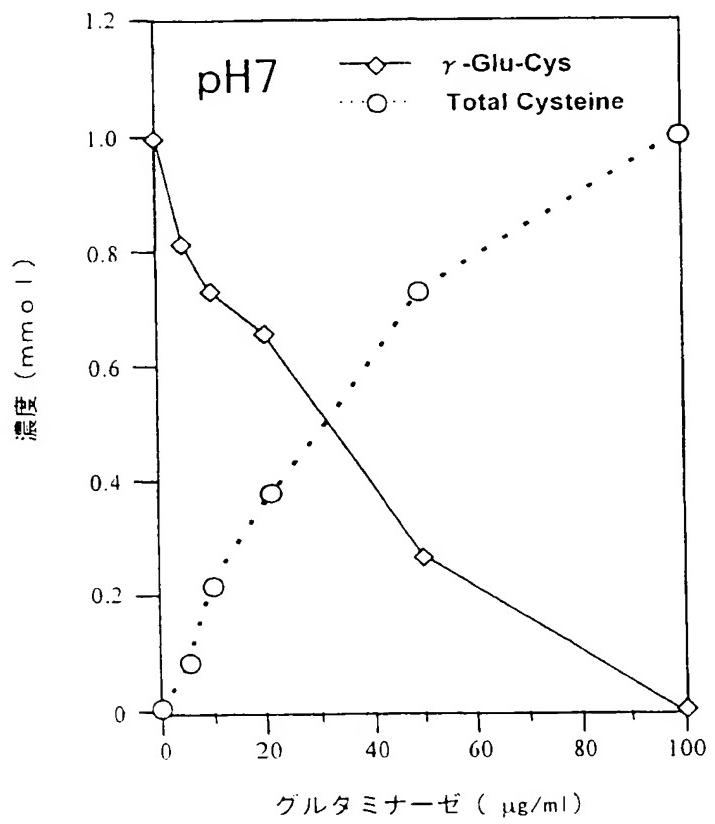


図 6

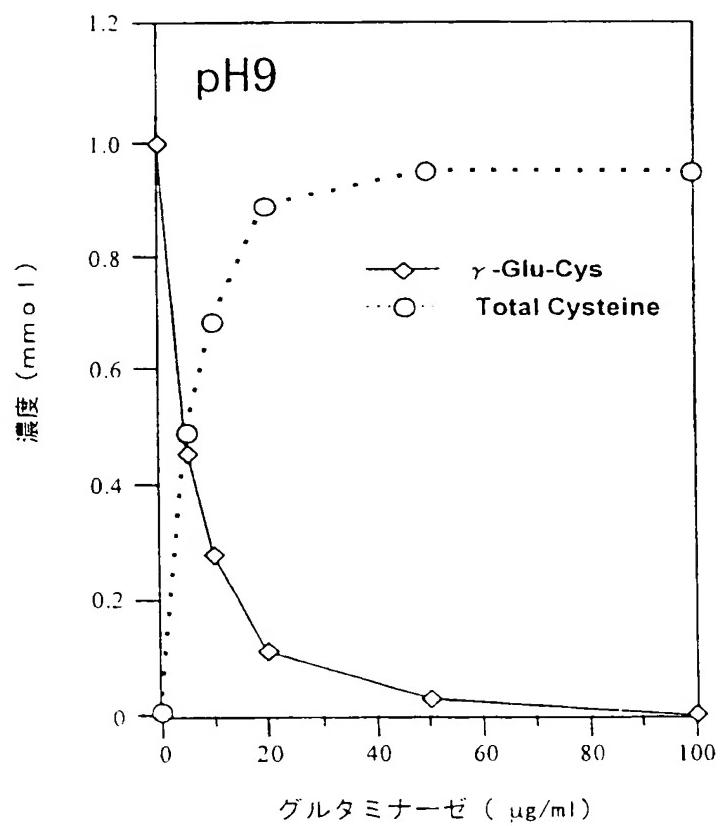
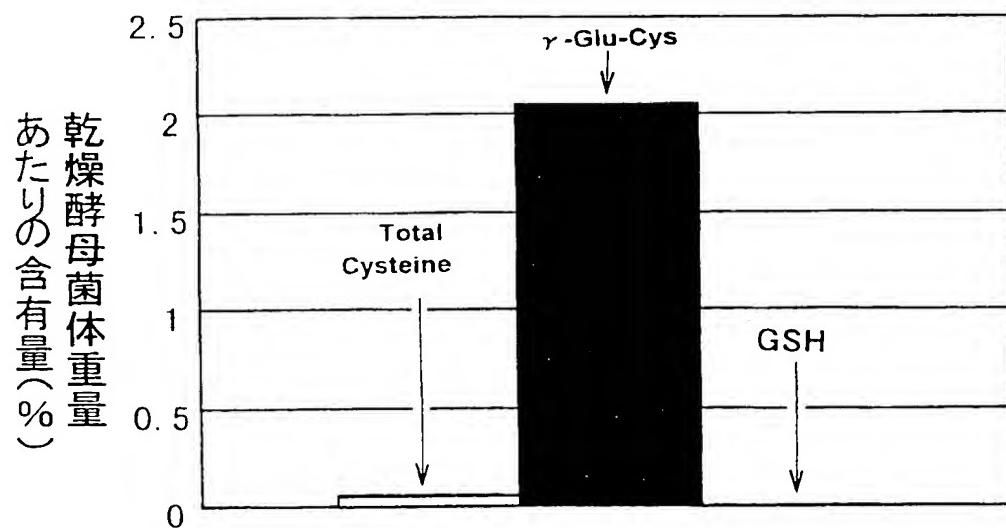
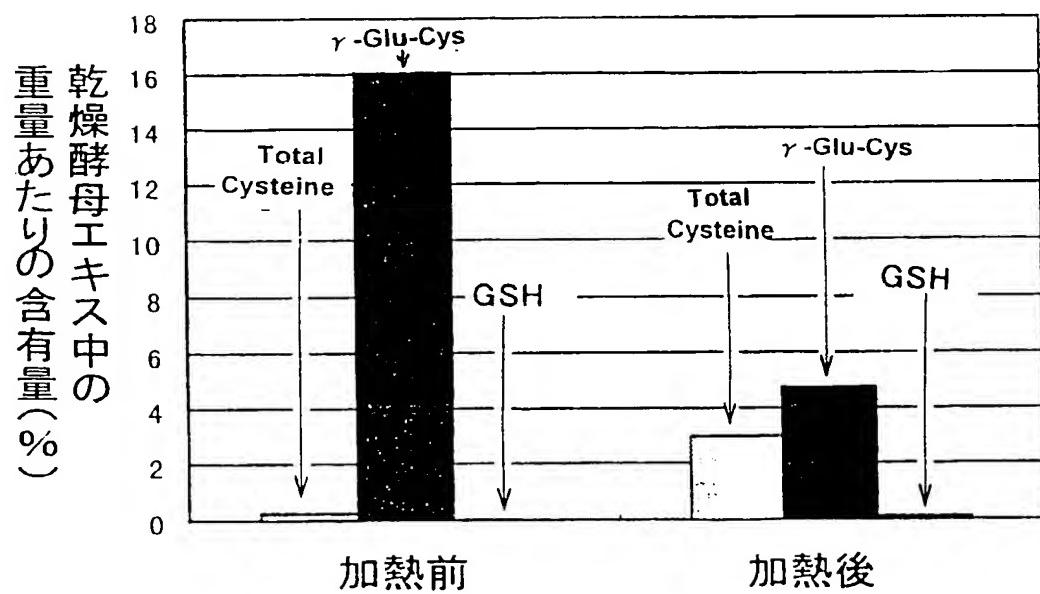


図 7



H4△GSH2株菌体中の含硫化合物量

図 8



H4△GSH2酵母エキス中の含硫化合物量の変化

1 / 2

配列表  
Sequence Listing

〈110〉 味の素株式会社 (Ajinomoto Co., Inc.)

〈120〉 食品の風味増強用素材の製造法

〈130〉 DF26PCT/B508

〈150〉 JP 10-335385

〈151〉 1998-11-26

〈150〉 JP 10-335386

〈151〉 1998-11-26

〈150〉 JP 11-194172

〈151〉 1999-07-08

〈150〉 JP 11-194209

〈151〉 1999-07-08

〈160〉 5

〈210〉 1

〈211〉 21

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Description of Artificial Sequence: primer

〈400〉 1

tatgaagact gtacagtctc c

21

〈210〉 2

〈211〉 34

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence

2 / 2

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: primer

&lt;400&gt; 2

ccggggagct cagctaaatg gtgtacttcg ctac 34

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: primer

&lt;400&gt; 3

attaaccgg gttgattcgg taatctccg 29

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: primer

&lt;400&gt; 4

attaaccgg ggtttttag ttttgcggc 30

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: primer

&lt;400&gt; 5

agctaaatgg tgtacttcgc tac 23

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/06576

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> A23L1/28, A23L1/221, A23L1/A23L1/227, A23L1/231

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A23L1/28, A23L1/22-A23L1/231, C12N1/19, C12P21/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI/L (QUESTEL), BIOSIS (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 8-228714, A (Ajinomoto Co., Ltd.), 10 September, 1996 (10.09.96), (Family: none)	1-9
A	JP, 6-70752, A (Asahi Breweries, Ltd.), 15 March, 1994 (15.03.94), (Family: none)	1-9
A	JP, 61-282397, A (Kohjin Co., Ltd.), 12 December, 1986 (12.12.86), (Family: none)	1-9

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

"A"	Special categories of cited documents: document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier document but published on or after the international filing date	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&"	document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		

Date of the actual completion of the international search  
21 February, 2000 (21.02.00)Date of mailing of the international search report  
07 March, 2000 (07.03.00)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP99/06576

## A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. Cl' A23L1/28, A23L1/221, A23L1/A23L1/227, A23L1/231

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. Cl' A23L1/28, A23L1/22~A23L1/231, C12N1/19, C12P21/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)  
WPI/L (QUESTEL), BIOSIS (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	J P, 8-228714, A (味の素株式会社) 10. 9月. 19 96 (10. 09. 96) (ファミリーなし)	1-9
A	J P, 6-70752, A (アサヒビール株式会社) 15. 3月. 1994 (15. 03. 94) (ファミリーなし)	1-9
A	J P, 61-282397, A (株式会社興人) 12. 12月. 1 986 (12. 12. 86) (ファミリーなし)	1-9

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「I」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

## 国際調査を完了した日

21. 02. 00

## 国際調査報告の発送日

07.03.00

## 国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

## 特許庁審査官(権限のある職員)

鈴木 恵理子

印

4N 8114

電話番号 03-3581-1101 内線 3448